猪胰高血糖素样肽 2 及其长效化物在大鼠体内的药代动力学研究

吕佳佳[1]　吴　杰[1]　齐珂珂[1]　徐子伟[2*]

（1.安徽农业大学动物科技学院，合肥 230036；2.浙江省农业科学院畜牧兽医研究所，杭州 310021）

摘　要：本试验旨在研究猪胰高血糖素样肽-2（p[Gly2]GLP-2）、聚乙二醇修饰猪胰高血糖素样肽 2（PEG-p[Gly2]GLP-2）和 p[Gly2]GLP-2 微球在大鼠体内的药代动力学过程，为利用 p[Gly2]GLP-2 修复断奶仔猪肠道损伤提供参考依据。18 只 280 g 左右的雄性 SD 大鼠，随机分为 3 组，分别单次皮下注射 p[Gly2]GLP-2（5.64 nmol/kg）、PEG-p[Gly2]GLP-2（5.64 nmol/kg）和 p[Gly2]GLP-2 微球（15 mg/只），定点采血后，酶联免疫吸附测定（ELISA）法测定胰高血糖素样肽-2(GLP-2)的血药浓度。结果表明：1) PEG-p[Gly2]GLP-2 的半衰期（$t_{1/2}$）是 p[Gly2]GLP-2 的 4 倍，血药浓度-时间曲线下面积（AUC_{0-t}）和平均滞留时间（MRT_{0-t}）是 p[Gly2]GLP-2 的 3 倍，清除率（CL）是 p[Gly2]GLP-2 的 1/2，2 者的达峰浓度（C_{max}）相差不大，PEG-p[Gly2]GLP-2 的达峰时间（T_{max}）滞后于 p[Gly2]GLP-2。2）p[Gly2]GLP-2 微球的达峰时间与 p[Gly2]GLP-2、PEG-p[Gly2]GLP-2 相差不大，但半衰期为（72.20±6.02）h，平均滞留时间为（90.66±7.41） h。结果提示，经聚乙二醇(PEG)修饰后 p[Gly2]GLP-2 的药代动力学行为发生了很大的改变，半衰期延长、达峰时间滞后、平均滞留时间延长、血浆清除减慢、生物利用度更高；p[Gly2]GLP-2 微球半衰期更长，且持续稳定的释放，操作便利。

关键字：p[Gly2]GLP-2；PEG-p[Gly2]GLP-2；p[Gly2]GLP-2 微球；药代动力学；大鼠

中图分类号：R285.5　　　文献标识码：　　　文章编号：

胰高血糖素样肽-2(glucagon-like peptide-2，GLP-2)通过特异性促进肠上皮细胞增殖、抑

收稿日期：2016-01-29
基金项目：现代农业产业技术体系（CARS-36）；浙江省自然科学基金项目（LY15C170002）
作者简介：吕佳佳(1989-),女,湖北黄冈人,硕士研究生,从事仔猪肠道保护研究。E-mail: 819708086@qq.com
*通信作者：徐子伟，研究员，博士生导师，E-mail: xzwfyz@sina.com

制肠上皮细胞凋亡[1]、增加肠道血液供应[2]、降低肠道渗透性[3]、抑制胃酸分泌[4]等方式来促进损伤肠黏膜结构的恢复以及吸收功能和屏障功能的改善。但猪 GLP-2（porcine glucagon-like peptide-2，pGLP-2)极易被血液中的二肽酰肽酶-Ⅳ(dipeptidyl peptidase-Ⅳ，DPP-Ⅳ)快速降解[5]，在体内的半衰期只有 8.4 min，需频繁用药。已在临床中应用的替度鲁肽[6]、处于研究阶段的延伸重组多肽（extended recombinant polypeptide，XTEN）修饰[7]及聚乙二醇（polyethylene glyeol，PEG）修饰[8-9]均有效地延长了 pGLP-2 在生物体内的释放时间。本课题组 Qi 等[9]使用单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺丙酸酯（mPEG-SPA）对 pGLP-2 进行修饰，使用一步阳离子交换层析法成功分离得到的 mPEG-Lys^{30}-p[Gly2]GLP-2 体外半衰期是用甘氨酸残基取代 pGLP-2 氨基末端第 2 位丙氨酸残基后形成的 p[Gly2]GLP-2 的 16 倍，可有效缓解小鼠的结肠炎病变。Wu 等[10]制备的 p[Gly2]GLP-2 微球在单次注射后能显著抑制结肠炎小鼠的体重下降及结肠变短，提高黏膜完整性、降低肠道炎症及促进小肠生长。以上研究证明对 pGLP-2 给药的探索是正确可行的，但其在动物机体的分布、消除等规律仍不明确。

本试验旨在考察 p[Gly2]GLP-2、PEG 修饰 p[Gly2]GLP-2（PEG-p[Gly2]GLP-2）和 p[Gly2]GLP-2 微球在大鼠体内的药代动力学特征，为 PEG-p[Gly2]GLP-2 治疗肠道损伤、p[Gly2]GLP-2 微球预防肠道损伤提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

mPEG-SPA[分子质量（MW）5 ku，北京凯正生物技术公司]; p[Gly2]GLP-2（MW 3 990.1，肽序列HGDGSFSDEMNTVLDNLATRDFINWLLHTKITDSL，杭州中肽生化有限公司）；CM Sepharose Fast Flow树脂（瑞士GE医疗生物科技公司）；超滤离心管（MW 3 000，美国Millipore公司）；酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（美国Millipore公司）；二甲基亚砜（DMSO，上海生物工程有限公司）；乳酸羟基乙酸共聚物（PLGA，lactic/glycolic 50:50，MW 14 000-17 000，sigma公司）；聚乙烯醇（PVA，MW 65 000-75 000，

上海生物工程有限公司）；PEG（MW 6 000，上海生物工程有限公司）；IKA RH basic1 磁力搅拌器（德国IKA公司）；PRO200型均质机（美国PRO Science公司）；EPOCH酶标仪（美国Bioteck公司）。

1.2　PEG-p[Gly2]GLP-2 的制备

参考Qi等[9]的方法，1.2 mg/mL p[Gly2]GLP-2溶解于50 mmol/L三（羟甲基）氨基甲烷（Tris-HCl）缓冲液(pH 8.5)，与mPEG-SPA以1∶6的摩尔比室温下反应30 min，1%的三氟乙酸（TFA）终止反应。用一步阳离子交换层析法进行分离得到mPEG-Lys^{30}-p[Gly2]GLP-2（MW 8 867）。

1.3　微球的制备

在参考 Wu 等[10]方法的基础上将载药量调为 2%制备微球，制备工艺如下：1 mg p[Gly2]GLP-2 冻干粉溶解于 12.5 μL DMSO 后，将其与 500 μL 含 50 mg PLGA，5 mg PEG 的二氯甲烷溶液混合，高速均质 30 s 制成初乳，并迅速倒入 20 mL 含 2%（w/v）PVA、5% NaCl 的水溶液中，2 000 r/min 磁力搅拌 3 min 得到复乳，将复乳倒入 100 mL 蒸馏水中 400 r/min 低速搅拌 3 h，离心收集微球，蒸馏水洗涤数遍，冷冻干燥。微球的粒径为（31.17±8.17）μm，包封率为 74.15%，突释率为 20.36%，实际载药量为 0.74%，体外 9 d 累计释放 37%。

1.4　试验动物

试验在浙江大学实验动物中心进行。将 18 只 280 g 左右的雄性 SD 大鼠按体重随机分为 3 组，每组 6 只，单笼饲养。

1.5　ELISA 测定

1.5.1　ELISA 试剂盒的测定条件

① 设定空白对照。

② QC1（GLP2-107）和 QC2（GLP2-207）测定的质量浓度分别在 2.9~7.7 ng/mL 和 13~28 ng/mL 之间。

③ 消除背景色的影响，样品在与 pGLP-2 检测抗体结合后，需要在 450 和 590 nm 的波长下测定其 OD 值，其中，450 nm 为检测波长，而 590 nm 波长下的 OD 值是背景色的误差。

④ 此 ELISA 试剂盒的测量范围为 1~64 ng/mL。

只有当以上所有条件都满足时，才认为 ELISA 试剂盒检测出的结果有效。

1.5.2 标准曲线

标准品（75 ng/mL），倍比稀释为 1.172、2.344、4.688、9.375、18.750、37.500 ng/mL 标准样品。按照试剂盒的方法进行操作，以去除 OD（空白对照）和 OD（590 nm）后的 OD 值为纵坐标，以标准样品的质量浓度（ng/mL）为横坐标，拟合的曲线符合 logistic 方程（四参数）。

1.6 大鼠体内的药代动力学试验

试验前 SD 大鼠禁食 12 h，自由饮水。p[Gly2]GLP-2 组皮下注射 5.64 nmol/kg 的 p[Gly2]GLP-2 溶液后分别于 4、8、12、16、30、45、60、90、150 min 时通过眼底静脉丛取血 0.5 mL；PEG-p[Gly2]GLP-2 组皮下注射同剂量的 PEG-p[Gly2]GLP-2 后分别于 5、15、20、30、45、60、120、240、360 min 时取血 0.5 mL；p[Gly2]GLP-2 微球组的注射剂量为 15 mg/只，采血时间为 10、20、30、60、120、180、360 min 和 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d。由于 p[Gly2]GLP-2 易被血中的 DPP-Ⅳ酶降解，故需将血样与 5 uL 的 DPP-Ⅳ抑制剂混合均匀，并于 4 ℃ 3 000 r/min 离心 15 min，取上层血清，于-80 ℃冰箱中保存。

血清样品按 ELISA 试剂盒的方法进行测定，测得的 OD 值代入标准曲线，求得不同时间点的血药浓度。

1.7 数据处理

运用 WinNonlin 5.2.1 版软件（Pharsight 公司，美国）对血药浓度与时间进行药代动力学拟合计算，获得各种给药下的血药浓度-时间曲线及相关的药代动力学参数。

2 结 果

2.1 ELISA 测定的准确性

pGLP-2 的标准曲线见图 1，为 $Y=(A-D)/[1+(X/C)^{B}]+D$，R^2=0.999 92，其中，A=3.489 43，B=-2.066 66，C=12.817 06，D=0.044 83。QC1 的浓度为 6.197 ng/mL，QC2 的浓度为 23.44 ng/mL，在有效范围内。

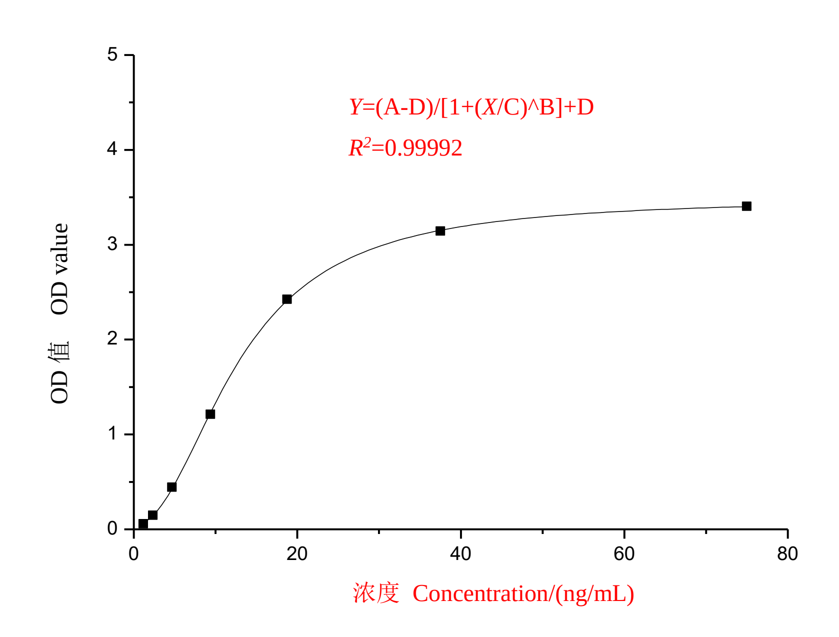


图 1 pGLP-2 的标准曲线

Fig.1 Standard curve of pGLP-2

2.2 p[Gly2]GLP 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 的血药浓度-时间曲线与药代动力学参数

皮下注射 p[Gly2]GLP-2 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 后，血药浓度-时间曲线见图 2，主要药代动力学参数见表 1。由图 2 可知，注射后，p[Gly2]GLP-2 组血药浓度迅速上升，在 16 min 左右达到峰值，随后迅速下降；PEG-p[Gly2]GLP-2 组血药浓度上升趋势平缓，在 30~45 min 达到最高，之后缓慢下降。分析药代动力学参数并结合血药浓度-时间曲线可知，PEG-p[Gly2]GLP-2 的半衰期（$t_{1/2}$）是 p[Gly2]GLP-2 的 4 倍，血药浓度-时间曲线下面积（$AUC_{0\text{-}t}$）和平均滞留时间（$MRT_{0\text{-}t}$）是 p[Gly2]GLP-2 的 3 倍，清除率（CL）是 p[Gly2]GLP-2 的 1/2。此外，达峰浓度（C_{max}）相差不大，PEG-p[Gly2]GLP-2 的达峰时间（T_{max}）滞后于

p[Gly2]GLP-2。

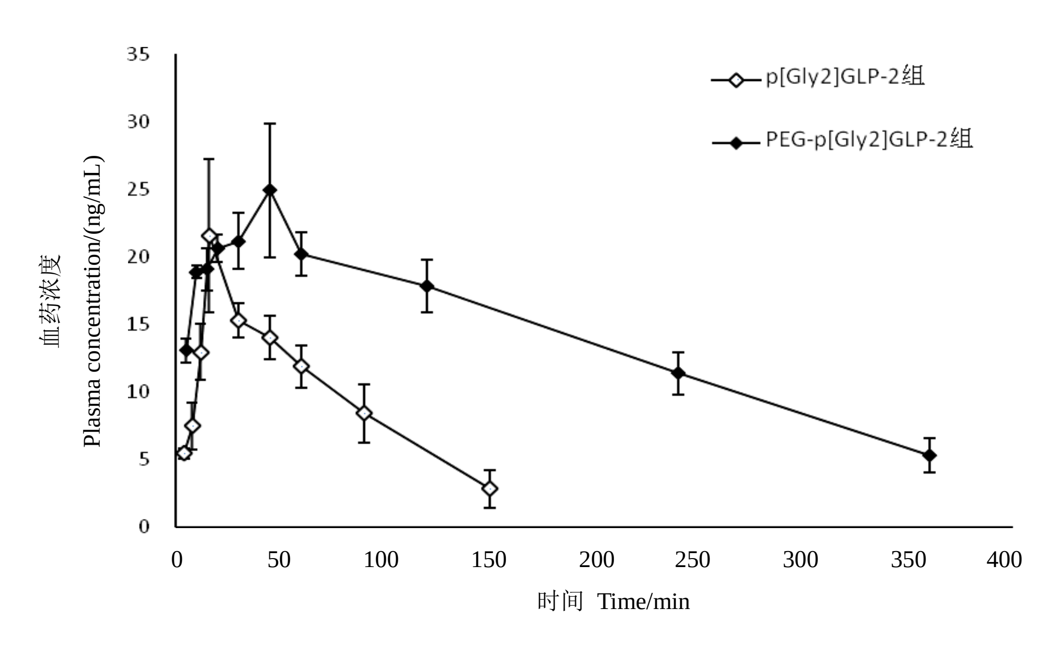


图 2 p[Gly2]GLP-2 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 的血药浓度-时间曲线

Fig.2 The plasma concentration-time profiles of p[Gly2]GLP-2 and PEG-p[Gly2]GLP-2

表 1 p[Gly2]GLP-2 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 在大鼠体内的药代动力学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters in rats of p[Gly2]GLP-2 and PEG-p[Gly2]GLP-2

项目 Items	猪胰高血糖素样肽-2 p[Gly2]GLP-2	聚乙二醇修饰猪胰高血糖素样肽 2 PEG-p[Gly2]GLP-2
半衰期 $t_{1/2}$/min	49.51±11.18	202.79±52.62
达峰时间 T_{max}/min	16.80±1.79	37.50±8.66
达峰浓度 C_{max}/(ng/mL)	22.92±6.16	24.03±4.88
血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{0\text{-}t}$/(ng·min/mL)	1 662.51±293.07	5 196.94±501.43
平均滞留时间 $MRT_{0\text{-}t}$/min	54.93±1.90	142.73±8.76
清除率 CL/[mL/(min·kg)]	13.43±4.96	7.28±1.58

2.3 p[Gly2]GLP-2 微球的血药浓度-时间曲线与药代动力学参数

皮下注射微球溶液后，血药浓度-时间曲线见图 3，主要药代动力学参数见表 2。分析药代动力学参数并结合血药浓度-时间曲线可知，p[Gly2]GLP-2 微球的达峰时间与

p[Gly2]GLP-2、PEG-p[Gly2]GLP-2 相差不大，但是半衰期为（72.20±6.02） h，平均滞留时间为（90.66±7.41） h，具有很好的缓释效果。

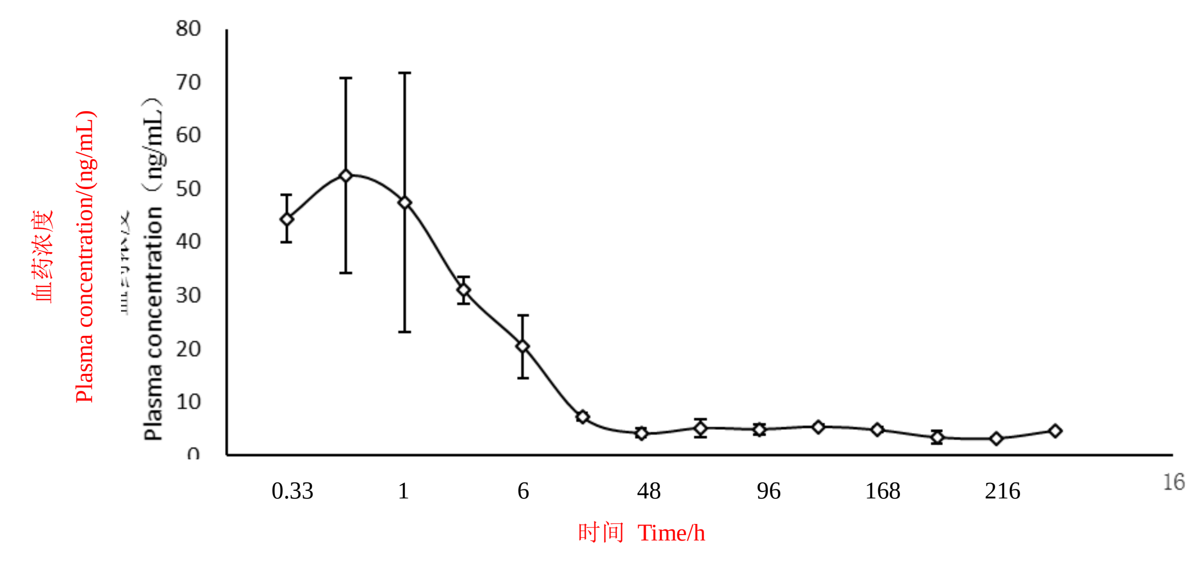


图 3 p[Gly2]GLP-2 微球的血药浓度-时间曲线

Fig.3 The plasma concentration-time profile of p[Gly2]GLP-2 microspheres

表 2 p[Gly2]GLP-2 微球在大鼠体内的药代动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters in rats of p[Gly2]GLP-2 microspheres

项目 Items	猪胰高血糖素样肽-2 微球 p[Gly2]GLP-2 microspheres
半衰期 $t_{1/2}$/h	72.20±6.02
达峰时间 T_{max}/h	0.25±0.12
达峰浓度 C_{max}/(ng/mL)	56.47±12.70
血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t}/(ng·h/mL)	1 129.51±163.97
平均滞留时间 MRT_{0-t}/h	90.66±7.41
清除率 CL/[mL/(h·kg)]	9.32±0.77

3 讨 论

3.1 p[Gly2]GLP-2 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 的药代动力学

自 Drucker 等[11]首次报道了 GLP-2 具有特异性促进肠黏膜生长与损伤修复的作用后，

大量的试验[1-4]也验证了这一结论，且发现 GLP-2 的作用效果要强于以往发现的其他非特异的肠生长因子。但是 pGLP-2 与其他蛋白多肽类药物一样，由于极易降解、水溶性差、体内循环半衰期短、生物利用度低等缺点而发展受限。特别是蛋白多肽易被机体免疫系统识别清除，导致血浆半衰期缩短，为了维持疗效，不得不增加剂量、频繁给药，从而使得操作繁琐、成本增加，更是加剧了免疫原性和毒性，增加了机体的应激。Boushey 等[12]连续 6 d，2 次/d 给小鼠注射 80 μg/kg 的人[Gly2]GLP-2；Drucker 等[13]则连续 10 d，2 次/d 给小鼠注射 17.5 μg/kg 的人[Gly2]GLP-2；Alavi 等[14]则连续 14 d 每天给大鼠静脉注射 50 μg/kg GLP-2，才可缓解试验动物的炎性反应。若要将 GLP-2 应用于仔猪上，不仅耗时耗力，更会加剧“仔猪断奶综合征”的应激。

为了克服蛋白多肽的种种限制，人们采取了许多措施，其中，最成功的便是将水溶性的PEG作为改性聚合物，与药物蛋白连接[15-16]，即PEG修饰。蛋白多肽经PEG修饰后拥有了一种屏障，不仅不易被蛋白酶水解，也降低了抗原与抗体的结合从而抑制免疫反应的发生，减少肾小球的过滤，降低肾清除率，增加了疏水性分子的溶解性，延长药物在体内的半衰期[17-18]。目前已经临床使用的PEG化的药物有：PEG-胰岛素，PEG-天冬酰胺酶，PEG-干扰素等。Qi等[8-9]制备的mPEG-Lys^{30}-p[Gly2]GLP-2体外半衰期是p[Gly2]GLP-2的16倍，可有效缓解小鼠的结肠炎病变和断奶仔猪的肠道损伤。但是其在动物机体的分布、消除等规律仍不明确，有待于进一步探究。

药代动力学是一门用数学手段分析药物体内动态变化过程的科学，具有重大的理论和实用价值。Lee 等[19]给大鼠静脉注射 1 μg/kg 的胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1，GLP-1)和赖氨酸被 PEG 修饰的 GLP-1(PEG$_{2K}$-Lys-GLP-1)后，发现 PEG$_{2K}$-Lys-GLP-1 的半衰期是 GLP-1 的 10 倍，平均滞留时间是 GLP-1 的 16 倍；而皮下注射 10 μg/kg 的 GLP-1 和 PEG$_{2K}$-Lys-GLP-1 后，发现 PEG$_{2K}$-Lys-GLP-1 的血药浓度-时间曲线下面积是 GLP-1 的 7.5 倍，半衰期是 GLP-1 的 2.5 倍，达峰时间是 GLP-1 的 3 倍。本试验发现，PEG-p[Gly2]GLP-2

的半衰期是 p[Gly2]GLP-2 的 4 倍，即 PEG 修饰可以延长蛋白质及肽类的半衰期，也就是说 PEG-p[Gly2]GLP-2 在大鼠体内停留的时间更久，消除的更慢，有利于药效的发挥。PEG-p[Gly2]GLP-2 的平均滞留时间是 p[Gly2]GLP-2 的 3 倍，这也意味着 PEG-p[Gly2]GLP-2 比 p[Gly2]GLP-2 在体内停留的时间更久，能更好的发挥药效。PEG-p[Gly2]GLP-2 的血药浓度-时间曲线下面积是 p[Gly2]GLP-2 的 3 倍，说明 PEG-p[Gly2]GLP-2 在体内的吸收程度更大，生物利用度更高。2 者的达峰浓度相差不大，但 PEG-p[Gly2]GLP-2 的达峰时间滞后很多。PEG-p[Gly2]GLP-2 的清除率是 p[Gly2]GLP-2 的 1/2，p[Gly2]GLP-2 的血药浓度下降的很快，而 PEG-p[Gly2]GLP-2 在给药后很长时间都维持一个较高的血药浓度。由此可知，经 PEG 修饰后 p[Gly2]GLP-2 的药代动力学行为发生了很大的改变：半衰期延长、达峰时间滞后、平均滞留时间延长、血浆清除减慢、生物利用度更高。这些改变极大地改善了蛋白多肽药物在机体内清除快、有效血药浓度持续时间短、需要频繁给药等缺点。

3.2 p[Gly2]GLP-2 微球的药代动力学

微球给药系统是近年来较为热门的给药方式，能够改变药物的运程、减少体内酶的降解、增加药物的作用时间、减少给药频率。经美国食品药品监督管理局（FDA）批准的专用于治疗前列腺癌的第 1 个多肽微球制剂—醋酸亮丙瑞林微球，可在人体内持续作用 30 d。Choi 等[20]制得的 GLP-1 微球在糖尿病大鼠体内持续稳定释放 2 周，使其体内的血糖水平维持在正常水平。刘琳娜等[21]研究了 GLP-2 微球在体内的缓释性能。Wu 等[10]的研究已经证明，结肠炎小鼠单次腹腔注射 10 mg 的 p[Gly2]GLP-2 微球，能有效抑制体重下降、结肠变短及炎性反应。

基于 p[Gly2]GLP-2 微球便利的给药方式和持续而稳定的释放方式，有望将其用于预防断奶仔猪的“仔猪断奶综合征”，但其在动物体内的释放方式及机制还是未知的。张海松等[22]发现，大鼠灌胃给予胸腺肽微球后的血药浓度、血药浓度-时间曲线下面积均大于胸腺肽胶囊，半衰期延长，生物利用度显著提高。陆蕾[23]给大鼠皮下注射干扰素$_{\alpha\text{-}2b}$-PLGA 缓释微

球和干扰素 $_{\alpha\text{-}2b}$ 注射剂后发现，2 组的达峰时间分别为 4、1.5 h，达峰浓度分别为 5 490.228、25 315.32 pg/mL，平均滞留时间分别为 6.855、0.099 d，血药浓度-时间曲线下面积分别为 23 149.018、2 309.497 pg·d/mL，且微球经过突释达到峰浓度，随后药物浓度缓慢下降，并长时间维持较低水平。肖田安等[24]发现伊维菌素聚乳酸(poly lactic acid, PLA)及 PLGA 2 种微球在比格犬体内均有明显缓释特性。Wu 等[10]制备的 p[Gly2]GLP-2 微球在单次注射后能显著抑制结肠炎小鼠的体重下降及结肠变短、提高黏膜完整性、降低肠道炎症、促进小肠生长。但是微球在动物体内的过程以及其作用机制依然未知。本试验发现 p[Gly2]GLP-2 微球的半衰期为（72.20±6.02） h，平均滞留时间为（90.66±7.41） h，远远大于 p[Gly2]GLP-2 和 PEG-p[Gly2]GLP-2 组，达峰时间则相差不大。观察血药浓度-时间曲线发现，给药后 20 min 左右，血药浓度达到一个高峰，这是由于微球表面黏附的 p[Gly2]GLP-2 所致的突释效应及少量 p[Gly2]GLP-2 从微球扩散而共同导致的，其后缓慢下降，到第 6 h 浓度基本不再下降，之后的 9 d，血药浓度都在此浓度（4.5 ng/mL）上下波动，这是因为微球具有缓释作用，在其能够测定的消除相可能仍有部分缓释药物释放。

微球的制造工艺不稳定，无法准确计算实际给药量，故不便与 p[Gly2]GLP-2 的药代动力学参数进行比较。但其独特的血药浓度-时间曲线，持续而稳定的释放方式及便利的给药方式，使其在预防断奶仔猪肠道疾病方面大有可为。

4 结 论

① 经 PEG 修饰后 p[Gly2]GLP-2 药代动力学行为发生了很大的改变，半衰期延长、达峰时间滞后、平均滞留时间延长、血浆清除减慢、生物利用度更高。极大地改善了多肽药物在机体内清除快、有效血药浓度持续时间短、需要频繁给药等缺点。

② p[Gly2]GLP-2 微球半衰期长，且持续稳定地释放，具有很好的缓释效果。这些特性决定了 p[Gly2]GLP-2 微球操作便利，减少了机体产生应激的可能。

参考文献：

[1] TSAI C H,HILL M,ASA S L,et al.Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice[J].American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,1997,273(1):E77–E84.

[2] GUAN X F,STOLL B,LU X F,et al.GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets[J].Gastroenterology,2003,125(1):136–147.

[3] BENJAMIN M A,MCKAY D M,YANG P C,et al.Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse[J].Gut,2000,47(1):112–119.

[4] WØJDEMANN M,WETTERGREN A,HARTMANN B,et al.Inhibition of sham feeding-stimulated human gastric acid secretion by glucagon-like peptide-2[J].The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,1999,84(7):2513–2517.

[5] PEDERSEN N B,HJOLLUND K R,JOHNSEN A H,et al.Porcine glucagon-like peptide-2:structure,signaling,metabolism and effects[J].Regulatory Peptides,2008,146(1/2/3):310–320.

[6] JEPPESEN P B,PERTKIEWICZ M,MESSING B,et al.Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure[J].Gastroenterology,2012,143(6):1473–1481.

[7] ALTERS S E,MCLAUGHLIN B,SPINK B,et al.GLP2-2G-XTEN:a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model[J].PLoS One,2012,7(11):50630.

[8] QI K K,WU J,DENG B,et al.PEGylated porcine glucagon-like peptide-2 improved the intestinal digestive function and prevented inflammation of weaning piglets challenged with

LPS[J].Animal,2015,9(9):1481–1489.

[9] QI K K,WU J,WAN J,et al.Purified PEGylated porcine glucagon-like peptide-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis[J].Peptide,2014,52:11–18.

[10] WU J,QI K K,XU Z W,et al.Glucagon-like peptide-2-loaded microspheres as treatment for ulcerative colitis in the murine model[J].Journal of Microencapsulation,2015,32(6):598–607.

[11] DRUCKER D J,ERILICH P,ASA S L,et al.Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1996,93(15):7911–7916.

[12] BOUSHEY R P,YUSTA B,DRUCKER D J.Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis[J].American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,1999,277(5):E937–E947.

[13] DRUCKER D J,YUSTA B,BOUSHEY R P,et al.Human [Gly^{2}]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis[J].American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Live Physiology,1999,276(1):G79–G91.

[14] ALAVI K,SCHWARTZ M Z,PALAZZO J P,et al.Treatment of inflammatory bowel disease in a rodent model with the intestinal growth factor glucagon-like peptide-2[J].Journal of Pediatric Surgery,2000,35(6):847–851.

[15] BAILON P,WON C Y.PEG-modified biopharmaceuticals[J].Expert Opinion on Drug Delivery,2009,6(1):1–16.

[16] HARRIS J M,CHESS R B.Effect of pegylation on pharmaceuticals[J].Nature Reviews Drug Discovery,2003,2(3):214–221.

[17] VERONESE F M,PASUT G.PEGylation,successful approach to drug delivery[J].Drug

Discovery Today,2005,10(21):1451–1458.

[18] FEE C J,ALSTINE J M V.PEG-proteins:reaction engineering and separation issues[J].Chemical Engineering Science,2006,61(3):924–939.

[19] LEE S H,LEE S,YOUN Y S,et al.Synthesis,characterization and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1[J].Bioconjugate Chemistry,2005,16(2):377–382.

[20] CHOI S,BAUDYS M,KIM S W.Control of blood glucose by novel GLP-1 delivery using biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA in type 2 diabetic rats[J].Pharmaceutical Research,2004,21(5):827–831.

[21] 刘琳娜,李欣,张琰等.胰高血糖素样肽-2/聚乳酸-羟基乙酸微球的制备及其体外释药性质研究[J].中国药房,2010(29):2755–2757.

[22] 张海松,刘卫红,张基展,等.口服胸腺肽微球在大鼠体内的药代动力学和生物利用度[J].中国生化药物杂志,2000,21(1):15–17.

[23] 陆蕾.干扰素 α-2b PLGA 缓释微球药代动力学及药效学研究[D].硕士学位论文.上海:第二军医大学,2006:18–29.

[24] 肖田安,怀彬彬,李帅鹏,等.伊维菌素 PLA 及 PLGA 微球混悬液在犬体内的药代动力学研究[J].华南农业大学学报,2014,35(3):8–12.

Pharmacokinetics Studies in Rats of Porcine Glucagon-like Peptide-2 and its long-acting forms

LYV Jiajia[1] WU Jie[1] QI Keke[1] XU Ziwei[2*]

(1. *College of Animal Science and Technology*，*Anhui Agricultural University*，*Hefei* 230036, *China;2. Institute of Animal Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, *China*)

Abstract: This study aimed to analyze the pharmacokinetics of porcine glucagon-like

*Corresponding author, professor, E-mail: xzwfyz@sina.com

(责任编辑 李慧英)

peptide-2[Gly2] (p[Gly2]GLP-2), PEGylated porcine glucagon-like peptide-2[Gly2] (PEG-p[Gly2]GLP-2) and p[Gly2]GLP-2 microspheres in rats, in order to provide references for the repairation of intestinal injury of weaned pigs by p[Gly2]GLP-2. Eighteen Sprague-Dawley (SD) male rats with 280 g body weight were randomly divided into 3 groups, p[Gly2]GLP-2 group (single subcutaneous administration of 5.64 nmol/kg p[Gly2]GLP-2), PEG-p[Gly2]GLP-2 group (single subcutaneous administration of 5.64 nmol/kg PEG-p[Gly2]GLP-2) and p[Gly2]GLP-2 microspheres group (single subcutaneous administration of 15 mg microspheres per rat). After blood sampled, plasma concentration of GLP-2 was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed as follows: 1) compared to p[Gly2]GLP-2, PEG-p[Gly2]GLP-2 increased the half-life（$t_{1/2}$）by 4-fold, and increased the mean residence time ($MRT_{0\text{-}t}$) and the area under the curve ($AUC_{0\text{-}t}$) by 3-fold, but decreased the clearance (CL) to a half. The peak concentration (C_{max}) was similar between two drugs, but peak time (T_{max}) of PEG-p[Gly2]GLP-2 was later than p[Gly2]GLP-2. 2) The half time of p[Gly2]GLP-2 microspheres was（72.20±6.02）h and mean residence time was（90.66±7.41）h, but peak time was similar with p[Gly2]GLP-2 and PEG-p[Gly2]GLP-2. These results show that PEGylated p[Gly2]GLP-2 greatly improve the pharmacological profiles, increase half time, peak time and mean residence time, decrease clearance rate and improve bioavailability. p[Gly2]GLP-2 microspheres with a longer half-life are released sustained and stable, and operated easily.

Key words: p[Gly2]GLP-2; PEG-p[Gly2]GLP-2; P[Gly2]GLP-2 microspheres; pharmacokinetics; rats